

CONCENTRACION DE ANTIGENOS EN VACUNAS INACTIVADAS*

ANTIGENIC CONCENTRATION IN INACTIVATED VACCINES*

J. J. Callis**

El Dr. Acha me ha pedido que presente el tema "Concentración de antígenos en vacunas inactivadas". Todos los datos que tengo sobre este tópico han sido obtenidos del Laboratorio de Enfermedades de los Animales de Plum Island y de las referencias que se citan. Espero que alguno de los presentes pueda aportar información adicional sobre concentración y purificación del virus aftoso para discutirla. Igualmente recibiremos con agrado cualquier comentario sobre concentración y purificación de otros virus que son utilizados para vacunas.

Tradicionalmente, hay mucha más información sobre concentración y purificación de virus de las plantas que de los animales. Esto se

Dr. Acha has asked that I discuss "Antigenic concentration in inactivated vaccines". All of the data that I have on this subject relates to foot-and-mouth disease virus (FMDV) and has been obtained from Plum Island Animal Disease Laboratory and the cited references. I hope others of you who have additional information on concentration and purification of FMDV will discuss it. Those who have comments on concentration and purification of other viruses which are then used for vaccine, hopefully will agree to contribute that information.

Traditionally there is much more information available on the concentration and purification of plant viruses than on animal

* En la Reunión del Comité Científico Asesor del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa en los días 8 al 12 de noviembre de 1971, algunos de sus miembros fueron invitados a presentar temas que, a manera de introducción, servirían para la discusión ulterior con el personal técnico del Centro. Consideramos estas presentaciones de gran importancia y utilidad para nuestros colegas del continente que trabajan en fiebre aftosa, por lo que publicamos la del Dr. J.J. Callis y su traducción al español, y en futuras ediciones presentaremos otras más.

** Director del Plum Island Animal Disease Laboratory, U.S.A.

* At the Meeting of the Advisory Committee of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center from the 8th-12th of November, 1971, several members have been asked to present topics, which served as an introduction for later discussions with the scientific staff of the Center. Considering these presentations of great importance and usefulness to our colleagues on the continent working with FMD, we publish Dr. Callis' paper and its translation into Spanish, and in future issues other papers will be presented.

** Director of the Plum Island Animal Disease Laboratory, U.S.A.

debe a que desde un principio hubo más posibilidades para producir en cantidades virus de las plantas. Es posible producir gramos de virus de las plantas con unos pocos kilogramos de tejidos huéspedes. Para la mayoría de los virus animales sólo en época reciente disponemos de medios para producir 1 a 10 microgramos de virus por kilo de tejido húmedo.

Los virus animales que han sido concentrados, purificados y usados como vacuna incluyen influenza, poliomielitis, adenovirus y más recientemente rabia y sarampión.

Cuando se piensa en concentración y purificación hay que tener en cuenta el uso a que se destinará el producto final. Esto nos permitirá decidir sobre el grado requerido de pureza y sobre las pruebas de control de pureza que deben ser aplicadas. Por ejemplo, si el virus va a ser usado en la producción de antisuero, debe estar libre de antígenos del huésped. Si va a ser usado en microscopía electrónica, debe estar desprovisto de partículas que tengan morfología similar a la del virus. Si va a ser utilizado en estudios químicos, debe estar libre de otras proteínas y aminoácidos. De un modo general, muchas pruebas de control de pureza son, en realidad, pruebas de impurezas cuya ausencia se admite como evidencia de pureza. Después de la purificación es necesario demostrar que las propiedades del virus no han variado y, por ejemplo, que no ha habido degradación. Tales mediciones, como la adsorción del espectro U.V., porcentaje de la composición de proteínas, de aminoácidos o de nucleótidos, o la tasa de sedimentación, realizadas en forma regular y sistemática pueden dar indicaciones sobre el producto que tenemos.

viruses. This is because there were means earlier to produce quantities of plant viruses. It is possible to produce grams of plant viruses in only a few kilograms of host tissue. For most animal viruses we have had means only fairly recently of producing only 1 to 10 micrograms of animal virus per kilogram of wet tissue.

Animal viruses that have been concentrated, purified and used as vaccines include influenza, polio, adeno viruses and more recently rabies and measles.

When one considers concentration or purification you should have some use in mind for the final product. This will allow you to decide upon the required degree of purity and also upon the tests for purity that are to be applied. For example, if the virus is to be used to produce antiserum it should be free of host antigens. If it is to be used for electron microscopy it should be free of particles that have similar morphology to the virus. If it is to be used for chemical study it should be free of other proteins and amino acids. In general though, most tests for purity are in fact tests for impurities, the absence being taken as evidence of purity. After purity one must also show that the properties of the virus remain the same and for example, that degradation does not occur. Such measurement as UV adsorption spectrum, percentage of protein, amino acid or nucleotide composition and sedimentation rate conducted on a regular or systematic basis will tell you something about your product.

Other tests or assays include infectivity or infection recovery, serology, electron microscopy,

Otras pruebas o ensayos incluyen la infecciosidad o la recuperación de la infección, la serología, la microscopía electrónica, la zona de difracción de la luz y las curvas de absorción en función de la temperatura (absorbence temperature profiles). Si las propiedades que se determinan con estas pruebas han permanecido invariables después del proceso de purificación, se admite que el virus ha sido purificado. Si durante la conservación, no permanecen invariables, se admite que la preparación o no estaba pura desde el inicio o está perdiendo esa condición. Cuantas más pruebas se puedan aplicar tanto mejor. Es necesario también analizar pruebas entre cada etapa.

La mayoría de los que se dedican a la concentración y purificación de virus coinciden en admitir que es necesaria una abundante información acerca del virus antes de comenzar el proceso de concentración. Se necesita conocer bien sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Sería oportuno mencionar algunas de ellas referentes al virus aftoso. El virus no tratado (crudo) resistirá a la congelación y descongelación. En cambio, el virus purificado en solución "buffer" fosfatada no resistirá, a menos que se le adicione EDTA o glicerina al 50%. El virus aftoso es especialmente sensible a los medios ácidos, y no es aconsejable una exposición prolongada a un pH 8,0 o mayor. La acidez descompone al virus en sus componentes, proteína y ácido nucleico. En cambio, no es afectado por las altas concentraciones molares de cloruro de cesio, tiene una isodensidad de 1,43 g/ml y puede ser centrifugado a través de una mezcla de cloroformo y octiol S de densidad 1,09 g/ml.

light scattering zone and absorbence temperature profiles. If the properties as determined by these tests remain the same as the virus is purified it is taken as evidence of purification. If on storage they do not remain the same this may be taken as evidence the preparation was not pure to start with or it is breaking down. The more tests that can be applied the better. It is also necessary to assay between each step.

Most all engaged in concentration and purification agree that a great deal of information is required about the virus before one begins to concentrate it. Much information is required about its physical, chemical and biological properties. It might be well to enumerate some of these for FMDV. Crude virus will withstand freezing and thawing. Purified virus in phosphate buffer will not unless it is kept in the presence of EDTA or 50% glycerin. FMDV is especially sensitive to acid conditions and extended exposure to pH 8.0 and higher is also not advisable. Acid degrades the virus into its protein and nucleic acid components. It is not affected by high molar concentrations of cesium chloride, possesses an isodensity of 1.43 g/ml and can be centrifuged through a mixture of chloroform and octiol S of density 1.09 g/ml.

Perhaps one of the first and most important steps in the whole procedure is careful selection of host medium. It should be uniform and easily infected and replicated. It should yield a high concentration of virus and as few other materials as possible that will interfere with purification.

Tal vez uno de los primeros pasos -y quizás más importante- de todo el procedimiento sea la cuidadosa selección del medio huésped. Debe ser uniforme y fácil de infectar y de producir. Debe producir virus a altas concentraciones y la menor cantidad posible de otras sustancias que puedan interferir en la purificación. Para la reproducción del virus aftoso son preferibles los cultivos celulares. Su facilidad de obtención junto con el hecho de que el producto final contiene pequeñas cantidades de otros componentes son las razones primordiales, a las que puede agregarse que los resultados son generalmente bien reproducibles y el costo más bajo.

Otro importante factor a ser considerado es la selección de la cepa de virus que se va a cultivar. Aquí se debe definir que es lo que se pretende hacer con el producto final puesto que si se trata de preparar vacunas, el proceso de selección es de importancia capital. Probablemente deba seleccionarse una cepa que esté causando problemas en el campo.

Cuando se comienza a cultivar, concentrar y purificar virus aftoso en sus varios tipos, subtipos y cepas, se pone en evidencia que no todos los virus poseen las mismas propiedades y en algunos casos, deben ser estudiados individualmente. No todas las cepas se reproducen en altas concentraciones y otras son difíciles de adaptar a un sistema celular. Otras no son estables, tienen tendencia a formar agregados y no se almacenan muy bien.

En Plum Island el primer virus utilizado con fines de purificación fue producido en monocapas de células renales de ternero. Más recientemente se ha desarrollado un método más perfeccionado de cultivar

For FMD virus replication, cell cultures are the preferred host. Their ease of production, together with the fact that the final product has fewer other constituents are the primary reasons, along with generally more reproducible results and lower costs.

Selection of the strain of virus to be replicated is another important factor to consider. Here again, you must define what it is you expect to do with the final product and in the case of compounding vaccines this selection process is paramount. The strain you select should probably be the one causing the problem in the field.

As you begin to propagate, concentrate and purify various FMDV types, subtypes and strains it becomes clear that all of the viruses do not possess the same properties and in some cases have to be studied individually. Not all strains replicate in high concentrations, some are difficult to adapt to the cell system. Others are not stable, have tendencies to aggregate and do not store very well.

At Plum Island the early virus that was used for purification purposes was produced in monolayers of calf kidney cells. More recently, improved methods of culturing calf kidney cells in two liter cylindrical Baxter bottles on a three tiered roller mill have been devised using the Brescia technology. In these racks, nineteen bottles are held as a single unit in a cylindrical wire cage. The cage is rotated at about 3 rpm an hour for an initial 2 hour period after which the speed is somewhat decreased.

células de riñón de ternero en botellas Baxter cilíndricas, de dos litros, colocadas en triple hilera en molino rodante, siguiendo la técnica de Brescia. En estos soportes, 19 botellas constituyen una unidad dentro de una jaula de alambre cilíndrica. Esta jaula gira a 3 rpm por un período inicial de dos horas y después la velocidad se disminuye un poco.

Los cultivos alcanzan su confluencia en 4 a 6 días, dependiendo de la célula, y en este momento se retira el medio de cultivo, en el momento antes de la infección. Durante la infección, alrededor de 40 ml de medio de cultivo está presente. Otro factor importante es el uso de un adecuado medio "buffer" de crecimiento, necesario para neutralizar la acidez que se produce durante la infección con el virus. Si esto no se tiene en cuenta, el ácido liberado puede descomponer al virus aftoso en su proteína y ácido nucleico.

Corrientemente las células que se usan en Plum Island son las BHK aisladas por primera vez por MacPherson y Stoker. Estas células crecen rápidamente y toleran la multiplicación de muchos virus aftosos. Las células BHK crecen en un medio consistente en solución de Eagle purificada, caldo triptosa fosfato y suero bovino tamponado con "buffer Tris".

Una vez inoculados los cultivos con el virus aftoso en 40 ml de medio de crecimiento con "buffer Tris", los líquidos infecciosos se colectan después de unas 22 horas aproximadamente, dependiendo del virus que se está utilizando y se trasvasan de las botellas de Baxter a recipientes de mayor capacidad. Estos líquidos generalmente contienen entre $10^{8,2}$ y $10^{8,9}$ ufp/ml por lo menos para las cepas A₁₁₉ y algunas otras.

The cultures reach confluency in 4 to 6 days, again, depending on the cell, at which time the growth medium is removed just prior to infection. During infection only about 40 ml of growth medium is present. Another important factor is to use an adequately buffered growth medium which is required to neutralize the acid produced during virus infection. If this is not done the acid that is released will otherwise split the foot-and-mouth disease virus into protein and nucleic acid constituents.

Currently the cell that is used at Plum Island is the BHK cell which was first isolated by MacPherson and Stoker. This cell grows rapidly and supports the multiplication of many FMD viruses. The BHK cell is grown in a medium consisting of purified Eagle's solution, tryptose phosphate broth and bovine serum buffered with Tris buffer.

After inoculation of the cultures with foot-and-mouth disease virus in 40 ml of Tris buffered growth medium, infectious fluids are collected after approximately 22 hours, depending upon the virus that is being propagated. The virus fluids are then poured from the Baxter bottles into larger containers. This fluid routinely contains about $10^{8.2}$ to $10^{8.9}$ pfu/ml for at least virus types A₁₁₉ and certain others.

At Plum Island the production of BHK cells has been scaled up to a point where we can now accommodate 108 of the cylindrical cages or a little over 2,000 of the 2 liter Baxter bottles. Considering, however, the capacity of the foot-and-mouth disease laboratory at Brescia, which has facilities for 28,000 2 liter

En Plum Island la producción de células BHK ha sido programada de modo que alcanza a un punto tal que permite acomodar 108 jaulas cilíndricas o algo más que contienen 2.000 botellas Baxter de 2 litros. Sin embargo, considerando la capacidad de los laboratorios de fiebre aftosa de Brescia, cuyos equipos permiten operar con 28.000 botellas de 2 litros o, considerando la capacidad de algunos de los establecimientos comerciales de la firma Burroughs Wellcome para el cultivo de las células BHK en suspensión, Plum Island es un laboratorio pequeño. No obstante que las células BHK han permitido la producción de cantidades crecientes de virus, tanto en monocapas como en suspensión, ellas deben ser usadas con cuidado. Mientras los primeros pasajes en células producen las cantidades de virus que se desean, los pasajes sucesivos pueden fallar muy gradualmente o en forma brusca; naturalmente, cuando esto ocurre es necesario volver a un pasaje anterior en células BHK.

En experiencias de purificación en pequeña escala, el virus propagado en cultivo de células BHK puede ser precipitado con la adición de metanol. Con este precipitado se vuelve a hacer una suspensión antes de centrifugar. Después, los líquidos sobrenadantes se decantan cuidadosamente y los sedimentos del fondo de las botellas se mezclan. Se agrega "buffer Tris" junto con EDTA. Los sedimentos se lavan sucesivamente con butanol y cloroformo y se recentrifuga en una ultracentrífuga empleando gradientes de densidad. Más recientemente se demostró que el polietilenglicol o Carbowax es un buen precipitante para el virus aftoso. Se clarifica el líquido de cultivo de tejido infeccioso con la adición de polietilenglicol en concentración a 6% peso/

bottles or, considering the capacity that some of the Burroughs-Wellcome commercial establishments have for propagating the BHK cell in suspension, Plum Island is small. While BHK cells have permitted the production of increasing amounts of virus both on monolayer and in suspension, they must nevertheless be used with caution. While early cell passages produce the desired quantities of virus, successive passages may very gradually or suddenly fail to do so and, of course, when this occurs it is necessary to return to an earlier BHK cell passage.

In small scale purification experiments the tissue culture propagated BHK cell virus can be precipitated by the addition of methanol. This methanol precipitate is then resuspended prior to centrifuging. Afterwards the supernatant fluids are carefully decanted. Pellets at the bottom of the bottles are pooled. Tris buffer is added together with EDTA. The pellets are successively washed and the pellet is then mixed with butanol and chloroform and recentrifuged in an ultracentrifuge using density gradients. More recently it has been shown that polyethylene glycol or carbowax is found to be an efficient precipitant for foot-and-mouth disease virus. The infective tissue culture fluid is clarified in polyethylene glycol added to 6% weight/volume concentration. The precipitates are collected and resuspended in 1/10th the original volume and reprecipitated with 6% polyethylene glycol. The second precipitate is resuspended to 1/60th of the original volume. The virus is purified from these concentrates by 2 cycles of cesium chloride

volumen. Se recogen los precipitados y se resuspenden a 1/10 del volumen original y se precipita con polietilenglicol a 6%. El segundo precipitado es resuspendido a 1/60 del volumen original. Partiendo de estos concentrados se purifica el virus a través de dos ciclos de ultracentrifugación con gradiente de densidad de cloruro de cesio. El virus purificado por estos medios es luego caracterizado físicamente por ultracentrifugación analítica y espectroscopía. La precipitación preliminar de la concentración del virus aftoso empleando polietilenglicol, en nuestras experiencias, demostró ser un procedimiento simple y rápido para el aislamiento inicial de antígenos de la fiebre aftosa. Mediante el uso de todos estos procedimientos de purificación surge que cada tipo del virus aftoso y posiblemente subtipo, aun cuando es clasificado como el mismo virus, tiene un comportamiento diferente durante la purificación y el almacenaje y es capaz de mantener propiedades diferentes cuando se usa en diversos experimentos inmunológicos.

Para finalizar, me gustaría enumerar tanto las ventajas como las desventajas de un antígeno del virus aftoso concentrado y purificado y espero escuchar luego algunas discusiones sobre este asunto.

Ventajas

1. Cuantificación fácil y exacta.
2. Libre de reacciones alérgicas.
3. Permite cuantificación de tipos.
4. Volúmenes menores.
5. Util en porcinos.
6. Almacenaje.

Desventajas

1. Dificultades técnicas.
2. Costo.
3. Riesgo de degradación y agregación.

density gradient ultracentrifugation. Virus is purified by this mean then physically characterized by analytical ultracentrifugation and spectroscopy. The preliminary precipitation of concentration of foot-and-mouth disease virus by the use of polyethylene glycol has proven, in our hands, to be a simple and rapid procedure for initial isolation of foot-and-mouth disease antigens. Through the use of all of these purification procedures it appears that each foot-and-mouth disease virus type and possibly subtype, although classified as the same virus, behaves distinctly during purification and storage and it is likely to retain distinct properties when used in various immunochemical experiments.

In closing I should like to list the advantages and disadvantages of a concentrated and purified FMDV antigen and hope to hear some discussion of the subject afterwards.

Advantages

1. Easily and accurately quantitated.
2. Free of allergic reactions.
3. Allows quantitation of types.
4. Smaller volumes.
5. Useful in swine.
6. Storage.

Disadvantages

1. Technical difficulties.
2. Expense.
3. Risk of degradation and aggregation.

REFERENCIAS - REFERENCES

BACHRACH, H.L. Foot-and-mouth disease. *Annual Rev. Microbiol.* 22: 201-244, 1968.

BACHRACH, H.L., BREESE Jr., S.S. Cell cultures and pure animal virus in quantity. *Methods in Virology* 4: 351-369, Academic Press, New York, 1968.

BRAKKE, M.K. Density-gradient centrifugation. *Methods in Virology* 2: 93-118, Academic Press, New York, 1967.

WAGNER, G.G., CARD, J.L., COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30 (4): 343-352, 1970.

1970
10/18
10/18